



JC979 U.S. PTO

09/919831



08/02/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

100 43 335.9

Anmeldetag:

2. September 2000

Anmelder/Inhaber:

Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung:

Neue für die Gene metR und metZ kodierende
Nukleotidsequenzen

IPC:

C 12 N, C 12 Q, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

**Neue für die Gene metR und metZ kodierende
Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für die Gene metR und metZ
kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien
5 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von
Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, durch Abschwächung
des metR- und/oder metZ-Gens.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere Methionin, finden in der
10 Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der
Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von
Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere
15 Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der
großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der
Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen
können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel
Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die
20 Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die
Zuckerkonzentration während der Fermentation oder die
Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel
Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen
Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst
25 betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion
und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man
Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph
30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die
Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene 5 amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von 10 Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L- 15 Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint.

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, 20 sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung sind isolierte Polynukleotide aus coryneformen Bakterien, die Polynukleotidsequenzen enthalten die für die Gene metR und/oder metZ kodieren, 25 ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit 30 einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,

- c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 5 d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,
- 10 e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b) c) oder d), und
- f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), c), d) oder e),

15 wobei die Polypeptide gemäß a) oder c) bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsaktivators MetR und die Polypeptide gemäß b) oder d) bevorzugt die Aktivität der O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase (MetZ) aufweisen.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls die oben genannten Polynukleotide, wobei es sich bevorzugt um replizierbare
20 DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
25 genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

30 Weitere Gegenstände sind:

eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz,
wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
5 beziehungsweise SEQ ID No. 3 dargestellt, enthält,

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen
Polynukleotid, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende
Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das metR-Gen und/oder
10 das metZ-Gen abgeschächt wird insbesondere durch
Deletion, Insertion oder Basenaustausch.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die
erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung
15 einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,
die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen
Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon
enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA
und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise
Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die
für den Transkriptions-aktivator MetR und/oder die O-
25 Succinylhomoserin-Sulphydrylase kodieren oder um solche
Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren,
die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
Transkriptionsaktivator MetR-Gens und/oder der des O-
Succinylhomoserin-Sulphydrylase-Gens aufweisen.

30 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung
enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren
Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen
hergestellt werden kann, die für den

Transkriptionsaktivator MetR und/oder die O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz
5 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

10 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein
15 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus
20 hergestellten Fragments.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen die Polypeptide gemäß SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Transkriptionsaktivators MetR und der O-Succinylhomoserin-Sulfhydrylase und auch
25 solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit den Polypeptiden gemäß SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3 und die genannten Aktivitäten aufweisen.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine,
30 die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die Aminosäuren produzieren und in denen die für das metR-Gen und/oder für das metZ-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen, beziehungsweise Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert, beziehungsweise das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 5 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-
Methionin produzierende Stamm

Corynebacterium glutamicum ATCC21608.

- 10 Den Erfindern gelang es, die neuen, für den
Transkriptionsaktivator MetR und das Enzym O-
Succinylhomoserin-Sulphydrylase kodierenden Gene metR und
metZ von *C. glutamicum* zu isolieren.

- 15 Zur Isolierung des metR-Gens, des metZ-Gens oder auch
anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank
dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*)
angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein
bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben.
Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und
Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag
20 Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von
Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual
(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine
sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes
W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in
25 λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and
General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine
Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des
Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of
the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E.*
30 *coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids
Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
(1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*

ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232 (1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurden die neue, für die Gene *metR* und *metZ* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine abgeleitet. In SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3 sind die sich ergebenden Aminosäuresequenzen der *metR*- und *metZ*-Genprodukte dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure

gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß

5 Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 10 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 oder SEQ ID 15 No. 3 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 20 unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im 25 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten 30 Bedingungen statt, d.h., es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d.h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der 35 Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der

Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschr

5 Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

10 Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's

15 Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

20 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur

25 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe

30 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des metR- und/oder des metZ-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
5 produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des metR- und/oder des metZ-Gens oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide
10 Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.
Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise
15 Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und
20 Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und
25 Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

30 Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al.
35 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762

- (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- 10 Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens 15 einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren 20 Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers 25 („Molekulare Genetik“, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1997), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1999) entnommen 30 werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

35

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann.

- 5 Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 15 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. 20 (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS 25 Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'- 30 Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

- Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) 35 wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro

hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach
5 homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz, erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde
10 beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

In das *metR*-Gen oder das *metZ*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut
15 werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *metR*-Gens und/oder des *metZ*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der
20 Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Methionin eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 30 • das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)),
- 5 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- 10 • das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931),
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),
- 15 • das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Methionin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des metR und/oder metZ Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der

- 20 Gruppe
- das für die Homoserine Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
 - das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),
 - 25 • das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),
- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151)

- das für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
 - das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der
- 10 Abschwächung des *metR*-Gens und/oder des *metZ*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).
- 15 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
- 20 zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
- 25 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
- 30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, 5 Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

10 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff- haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und 15 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. 20 Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen 25 eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

30 Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können 35 Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester

eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff
5 oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat.
10 Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender
15 Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von
20 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.
(Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring
25 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.
30 entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
5 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)
beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell
gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer
10 Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)
dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1
(Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of
Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1
Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem
Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)
gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase
20 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym
BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.
Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der
25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)
behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit
Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La
30 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al.
1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen
in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der

- Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
- 5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung der Gene metR und metZ

- 10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
- 15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
- 20 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).
- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung
- 25 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der
- 30 Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm

DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin
5 ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings
10 of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.
15 Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt,
20 Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die
Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem
25 zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1
30 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab zwei offene Leseraster von 567 Basenpaaren und 1146 Basenpaaren, welche als metR-Gen und metZ-Gen bezeichnet wurden. Das metR-Gen kodiert für ein Protein von 189 Aminosäuren, das metZ-Gen kodiert für ein Protein von 382 Aminosäuren.

•

•

5

<130> 000369 BT

10

<160> 3

15

<210> 1

<211> 2628

<212> DNA

20

<220>

<221> CDS

 $\langle 222 \rangle \quad (447) \dots (1013)$

25

<220>

<221> CDS

<222> (1038) .. (2183)

30

<400> 1

cggtcacggtt gggatcggttg tcaaaactcc ccagtggttt cacttcataa actcgcqqaq 60

35

ggcagcaagc ccagcgccat taatcagagc ggtgaaataa acatggttca tgattatgtc 180

40

tgttccgtgg aaaagggggc cctgatctag ctgattattc atcgcagtaa gcgcctttcgg 300

taggtgggtg aatcatcgta gtcttccgag ccccgtagacc cgatccqttt tqtqcaatcc 360

45

gttctttaaag cgacattatt gtctgc atg gaa gac gat ctc agt gct gct ctc 473
Met Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ala Leu

50

gtc aaa gcg ctt ttc gac gcg cga acc caa cgc agg ctc tct atc tcg 521
Val Lys Ala Leu Phe Asp Ala Arg Thr Gln Arg Arg Leu Ser Ile Ser
10 15 20 25

55

gaa aac gca gag gcg caa cca agc gct qca tta ctt qga cgc ctt tcc 617

	Glu	Asn	Ala	Glu	Ala	Gln	Pro	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Arg	Leu	Ser	
				45					50					55			
5	ggt	gca	ttg	ggt	atg	acg	ctt	tcg	gag	ctc	att	gca	cag	gct	gaa	ggt	665
	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Ile	Ala	Gln	Ala	Glu	Gly	
			60					65					70				
10	ggc	tat	gac	cgg	ggc	gct	cgg	cgg	tca	aag	cag	tct	gta	tggt	aca	gat	713
	Gly	Tyr	Asp	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Ser	Lys	Gln	Ser	Val	Trp	Thr	Asp	
		75					80					85					
15	cca	gct	acc	ggt	tac	aca	cgg	cgt	gca	gtg	tca	cag	ccg	tca	gaa	tcc	761
	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Ser	Gln	Pro	Ser	Glu	Ser	
		90				95					100					105	
20	cca	cta	gaa	cta	gtg	gaa	gta	atg	ctg	cct	cct	ggg	gcg	gaa	gtt	ggc	809
	Pro	Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Met	Leu	Pro	Pro	Gly	Ala	Glu	Val	Gly	
					110				115						120		
25	tac	cca	gct	gat	gct	tat	cgt	ttc	atg	gat	cag	gtg	gtc	tggt	gta	ctc	857
	Tyr	Pro	Ala	Asp	Ala	Tyr	Arg	Phe	Met	Asp	Gln	Val	Val	Trp	Val	Leu	
				125					130					135			
30	gaa	ggg	gcc	gtt	cgt	att	act	gaa	ggt	gaa	gag	gtc	cac	gaa	ctt	tca	905
	Glu	Gly	Ala	Val	Arg	Ile	Thr	Glu	Gly	Glu	Glu	Val	His	Glu	Leu	Ser	
			140					145					150				
35	acg	ggg	gat	tgt	cta	cgg	ttt	ggg	cct	ccg	cga	gat	acc	gac	ttt	gct	953
	Thr	Gly	Asp	Cys	Leu	Arg	Phe	Gly	Pro	Pro	Arg	Asp	Thr	Asp	Phe	Ala	
		155					160					165					
40	aat	ccc	acc	acc	gta	gcc	act	agg	tat	tta	gtt	gcc	ttg	gac	aag	cgt	1001
	Asn	Pro	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Arg	Tyr	Leu	Val	Ala	Leu	Asp	Lys	Arg	
		170				175					180					185	
45	gta	cct	cgt	gct	tgatataaca	agtaaggaag	cctg	atg	aat	ttt	tac	cca					1052
	Val	Pro	Arg	Ala							Met	Asn	Phe	Tyr	Pro		
											190						
50	cca	tct	gta	cct	att	aac	cct	gcg	tggt	cgt	cca	ccc	aca	gta	act	gtg	1100
	Pro	Ser	Val	Pro	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Arg	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Val	
		195				200					205					210	
55	caa	gcg	gga	cgg	cca	gcc	aga	act	cct	ggt	gcg	ccg	atg	aac	cca	cct	1148
	Gln	Ala	Gly	Arg	Pro	Ala	Arg	Thr	Pro	Gly	Ala	Pro	Met	Asn	Pro	Pro	
					215					220					225		
60	atc	acg	ttg	tcc	agc	act	tat	gtt	cat	gat	tca	gaa	aaa	gct	tat	ggg	1196
	Ile	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Tyr	Val	His	Asp	Ser	Glu	Lys	Ala	Tyr	Gly	
				230					235					240			
65	cgc	gat	ggc	aat	gat	gga	tggt	ggt	gca	ttt	gag	gct	gcc	atg	gga	act	1244
	Arg	Asp	Gly	Asn	Asp	Gly	Trp	Gly	Ala	Phe	Glu	Ala	Ala	Met	Gly	Thr	
			245					250					255				
70	cta	gat	ggt	ggg	ttc	gcg	gta	tct	tat	tct	tca	ggt	ttg	gca	gcg	gca	1292
	Leu	Asp	Gly	Gly	Phe	Ala	Val	Ser	Tyr	Ser	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	
		260					265					270					

	acg	tcg	att	gct	gat	ttg	gtt	cct	act	ggg	ggc	aca	gtt	gtt	tta	cct	1340
	Thr	Ser	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Thr	Gly	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Pro	
	275					280					285					290	
5	aaa	gct	gcc	tat	tat	ggc	gtg	acc	aat	att	ttc	gcc	agg	atg	gaa	gcc	1388
	Lys	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Val	Thr	Asn	Ile	Phe	Ala	Arg	Met	Glu	Ala	
					295					300					305		
10	cgc	gga	agg	ctg	aag	gtt	cga	act	gtt	gat	gca	gac	aat	acc	gaa	gaa	1436
	Arg	Gly	Arg	Leu	Lys	Val	Arg	Thr	Val	Asp	Ala	Asp	Asn	Thr	Glu	Glu	
				310					315					320			
15	gtg	att	gct	gct	gct	caa	ggg	gca	gat	gtg	gtg	tgg	gtg	gaa	tcg	atc	1484
	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Asp	Val	Val	Trp	Val	Glu	Ser	Ile	
			325					330					335				
20	gct	aat	ccg	acg	atg	gtg	gta	gct	gat	atc	cct	gca	ata	gtc	gac	ggg	1532
	Ala	Asn	Pro	Thr	Met	Val	Val	Ala	Asp	Ile	Pro	Ala	Ile	Val	Asp	Gly	
		340					345					350					
25	gtg	cgt	ggg	ctt	gga	gtt	ttg	act	gtc	gtt	gac	gcg	act	ttc	gca	acg	1580
	Val	Arg	Gly	Leu	Gly	Val	Leu	Thr	Val	Val	Asp	Ala	Thr	Phe	Ala	Thr	
	355					360					365					370	
30	cca	ctt	cgt	caa	cgt	cca	ttg	gaa	ctt	ggg	gct	gat	att	gtg	ctt	tac	1628
	Pro	Leu	Arg	Gln	Arg	Pro	Leu	Glu	Leu	Gly	Ala	Asp	Ile	Val	Leu	Tyr	
					375					380					385		
35	tcg	gca	acc	aaa	ctt	atc	ggg	gga	cac	tct	gat	ctt	ctt	ctt	gga	gtc	1676
	Ser	Ala	Thr	Lys	Leu	Ile	Gly	Gly	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	
				390					395					400			
40	gca	gtg	tgc	aag	tct	gag	cac	cat	gcg	cag	ttt	ctt	gcc	act	cac	cgt	1724
	Ala	Val	Cys	Lys	Ser	Glu	His	His	Ala	Gln	Phe	Leu	Ala	Thr	His	Arg	
			405					410					415				
45	cat	gat	cat	ggg	tca	gtg	ccg	gga	ggg	ctt	gaa	gcg	ttt	ctt	gct	ctc	1772
	His	Asp	His	Gly	Ser	Val	Pro	Gly	Gly	Leu	Glu	Ala	Phe	Leu	Ala	Leu	
		420					425					430					
50	cgt	gga	ttg	tat	tcc	ttg	gcg	gtg	cgt	ctt	gat	cga	gca	gaa	tcc	aac	1820
	Arg	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ala	Val	Arg	Leu	Asp	Arg	Ala	Glu	Ser	Asn	
	435					440					445					450	
55	gca	gca	gaa	ctt	tcg	cgg	cga	ctt	aac	gcg	cat	cct	tcg	gtt	acc	cgc	1868
	Ala	Ala	Glu	Leu	Ser	Arg	Arg	Leu	Asn	Ala	His	Pro	Ser	Val	Thr	Arg	
					455					460					465		
60	gtc	aat	tat	cca	gga	ctt	cct	gat	gat	ccc	caa	cat	gaa	aaa	gcc	gtg	1916
	Val	Asn	Tyr	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Pro	Gln	His	Glu	Lys	Ala	Val	
				470					475					480			
65	cga	gtc	cta	ccc	tct	gga	tgt	gga	aac	atg	ttg	tca	ttt	gag	ctt	gat	1964
	Arg	Val	Leu	Pro	Ser	Gly	Cys	Gly	Asn	Met	Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Asp	
			485					490					495				
70	gca	aca	cct	gaa	cga	act	gat	gag	att	ctc	gaa	agc	ctg	tca	ctt	tta	2012
	Ala	Thr	Pro	Glu	Arg	Thr	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	
		500					505					510					

5 acc cac gcg acc agt tgg gga ggt gtg gaa aca gcc att gaa cgt cgc 2060
 Thr His Ala Thr Ser Trp Gly Gly Val Glu Thr Ala Ile Glu Arg Arg
 515 520 525 530

acc agg cgg gat gct gaa gtg gtg gca gga gta ccg atg act ctt tgc 2108
 Thr Arg Arg Asp Ala Glu Val Val Ala Gly Val Pro Met Thr Leu Cys
 535 540 545

10 cgc gtt tcc gta gga att gaa gac gtt gaa gat cta tgg gaa gac ctc 2156
 Arg Val Ser Val Gly Ile Glu Asp Val Glu Asp Leu Trp Glu Asp Leu
 550 555 560

15 aac gcc tca atc gac aaa gtt ctg ggt tagaactcgt agccagtaac 2203
 Asn Ala Ser Ile Asp Lys Val Leu Gly
 565 570

20 cagaccttca gtgtttggtt gccactccag tgctggggcg acatgatcag cgaagttctt 2263
 caggatcgac gcgttgatct caacacccat ttggttgggg gcggtgagca tcaaggtgtc 2323
 ggcttccatc acagctttgt cttccttgag ctggtcgatg agttcatcgg gacttccggc 2383

25 gtagctgcga ccgaacgtgg atcgggtatc atccaggatt cctacttggg caccgccttg 2443
 tccctgaagt ccgaaaagct cacggtcgcg gtcggtgacg atcggaaga tggacctgga 2503
 gacagacaca cgtgggggtcc aatcgtgtcc ggcttctttc caagcttggc ggtagaacgc 2563

30 gatttgatcg gcttgcagat ccccgaagga ttggccggtg gcttcggcga cgagggtgga 2623
 gctca 2628

35 <210> 2
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

40 <400> 2
 Met Glu Asp Asp Leu Ser Ala Ala Leu Val Lys Ala Leu Phe Asp Ala
 1 5 10 15

45 Arg Thr Gln Arg Arg Leu Ser Ile Ser Ala Leu Ala Glu Ser Ser Gly
 20 25 30

Val Ser Arg Ala Met Ile Ser Arg Val Glu Asn Ala Glu Ala Gln Pro
 35 40 45

50 Ser Ala Ala Leu Leu Gly Arg Leu Ser Gly Ala Leu Gly Met Thr Leu
 50 55 60

55 Ser Glu Leu Ile Ala Gln Ala Glu Gly Gly Tyr Asp Arg Gly Ala Arg
 65 70 75 80

Arg Ser Lys Gln Ser Val Trp Thr Asp Pro Ala Thr Gly Tyr Thr Arg
 85 90 95

Arg Ala Val Ser Gln Pro Ser Glu Ser Pro Leu Glu Leu Val Glu Val

	100	105	110
	Met Leu Pro Pro Gly Ala Glu Val Gly Tyr Pro Ala Asp Ala Tyr Arg		
	115	120	125
5	Phe Met Asp Gln Val Val Trp Val Leu Glu Gly Ala Val Arg Ile Thr		
	130	135	140
10	Glu Gly Glu Glu Val His Glu Leu Ser Thr Gly Asp Cys Leu Arg Phe		
	145	150	155
	Gly Pro Pro Arg Asp Thr Asp Phe Ala Asn Pro Thr Thr Val Ala Thr		
	165	170	175
15	Arg Tyr Leu Val Ala Leu Asp Lys Arg Val Pro Arg Ala		
	180	185	
20	<210> 3		
	<211> 382		
	<212> PRT		
	<213> Corynebacterium glutamicum		
25	<400> 3		
	Met Asn Phe Tyr Pro Pro Ser Val Pro Ile Asn Pro Ala Trp Arg Pro		
	1	5	10
	Pro Thr Val Thr Val Gln Ala Gly Arg Pro Ala Arg Thr Pro Gly Ala		
	20	25	30
30	Pro Met Asn Pro Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr Tyr Val His Asp Ser		
	35	40	45
35	Glu Lys Ala Tyr Gly Arg Asp Gly Asn Asp Gly Trp Gly Ala Phe Glu		
	50	55	60
	Ala Ala Met Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Ala Val Ser Tyr Ser Ser		
	65	70	75
40	Gly Leu Ala Ala Ala Thr Ser Ile Ala Asp Leu Val Pro Thr Gly Gly		
	85	90	95
	Thr Val Val Leu Pro Lys Ala Ala Tyr Tyr Gly Val Thr Asn Ile Phe		
	100	105	110
45	Ala Arg Met Glu Ala Arg Gly Arg Leu Lys Val Arg Thr Val Asp Ala		
	115	120	125
50	Asp Asn Thr Glu Glu Val Ile Ala Ala Ala Gln Gly Ala Asp Val Val		
	130	135	140
	Trp Val Glu Ser Ile Ala Asn Pro Thr Met Val Val Ala Asp Ile Pro		
	145	150	155
55	Ala Ile Val Asp Gly Val Arg Gly Leu Gly Val Leu Thr Val Val Asp		
	165	170	175
	Ala Thr Phe Ala Thr Pro Leu Arg Gln Arg Pro Leu Glu Leu Gly Ala		
	180	185	190

Asp Ile Val Leu Tyr Ser Ala Thr Lys Leu Ile Gly Gly His Ser Asp
195 200 205

5 Leu Leu Leu Gly Val Ala Val Cys Lys Ser Glu His His Ala Gln Phe
210 215 220

10 Leu Ala Thr His Arg His Asp His Gly Ser Val Pro Gly Gly Leu Glu
225 230 235 240

Ala Phe Leu Ala Leu Arg Gly Leu Tyr Ser Leu Ala Val Arg Leu Asp
245 250 255

15 Arg Ala Glu Ser Asn Ala Ala Glu Leu Ser Arg Arg Leu Asn Ala His
260 265 270

Pro Ser Val Thr Arg Val Asn Tyr Pro Gly Leu Pro Asp Asp Pro Gln
275 280 285

20 His Glu Lys Ala Val Arg Val Leu Pro Ser Gly Cys Gly Asn Met Leu
290 295 300

Ser Phe Glu Leu Asp Ala Thr Pro Glu Arg Thr Asp Glu Ile Leu Glu
305 310 315 320

25 Ser Leu Ser Leu Leu Thr His Ala Thr Ser Trp Gly Gly Val Glu Thr
325 330 335

30 Ala Ile Glu Arg Arg Thr Arg Arg Asp Ala Glu Val Val Ala Gly Val
340 345 350

Pro Met Thr Leu Cys Arg Val Ser Val Gly Ile Glu Asp Val Glu Asp
355 360 365

35 Leu Trp Glu Asp Leu Asn Ala Ser Ile Asp Lys Val Leu Gly
370 375 380

40

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, das eine Polynukleotidsequenz enthält die für die Gene metR und/oder metZ kodiert , ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,
 - c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
15 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
20 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,
 - e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b), c) oder d), und
 - f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), c), d) oder e).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
30 eine RNA ist.

4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
 - 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz
 - (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
 - (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - 10 (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass die Hybridisierung von Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend
15 höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 und/oder SEQ ID No. 3 enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das metR-Gen und/oder
20 metZ-Gen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
 - 25 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das metR und/oder das metZ-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

- 5 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten Aminosäure verringern.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression
des (der) Polynukleotids (e), das (die) für das metR
und/oder das metZ-Gen kodiert (kodieren) verringert
bzw. abschwächt.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die katalytischen
Eigenschaften der Polypeptide (Enzymprotein) abschwächt,
für das die Polynukleotide metR und/oder metZ kodieren.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 30 14.1 das für eine feed back resistente
Aspartatkinase kodierende lysC-Gen,

- 14.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende gap-Gen,
- 14.3 das für die Pyruvat-Carboxylase
kodierende Gen pyc,
- 5 14.4 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen tpi
- 14.5 das für die Homoserin O-Acetyltransferase
kodierende Gen metA
- 10 14.6 das für die Cystathionin-gamma-Synthase
kodierende Gen metB
- 14.7 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk
- 14.8 das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende
Gen aecD
- 15 14.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase
kodierende glyA-Gen
- 14.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase
kodierende metY-Gen

20 verstärkt bzw. überexprimiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
25 gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe

- 15.1 das für die Homoserine Kinase kodierende Gen
thrB

- 15.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen
ilvA
- 15.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen
thrC
- 5 15.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase
kodierende Gen ddh
- 15.5 das für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
kodierende Gen pck
- 10 15.6 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen pgi
- 15.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
abschwächt.
16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1f trägt.
- 15 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man
Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum
einsetzt.
- 20 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für die für die O-Succinylhomoserin-
Sulphydrylase (metZ) und/oder den
Transkriptionsaktivator MetR kodieren oder eine hohe
Ähnlichkeit mit der Sequenz des O-Succinylhomoserin-
Sulphydrylase (metZ) Gens bzw. des
25 Transkriptionsaktivators MetR aufweisen,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3
30 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die für die metR und/oder metZ-Gene kodierenden Polynukleotide aus coryneformen Bakterien, die Polynukleotidsequenzen enthalten, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,
- 15 c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 20 d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,
- e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) b), c) oder d), und
- 25 f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b), c), d) oder e)

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das metR-Gen und/oder metZ-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die
30 erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.